

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017837

International filing date: 01 December 2004 (01.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-403654
Filing date: 02 December 2003 (02.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PGT/JP2004/017837

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

02.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 日
Date of Application:

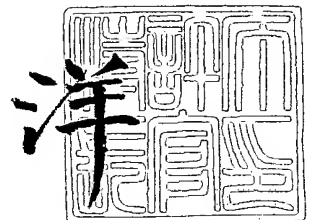
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 0 3 6 5 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 0 3 6 5 4]

出 願 人 メルシャン株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 2 0 9

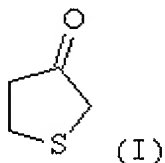
【書類名】 特許願
【整理番号】 H15-0938
【提出日】 平成15年12月 2日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県磐田市中泉 1 7 9 7 - 1 2 5
 【氏名】 永井 葉月
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県磐田市中泉 1 7 9 7 - 2 2 6
 【氏名】 伊藤 将士
【特許出願人】
 【識別番号】 000001915
 【住所又は居所】 東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号
 【氏名又は名称】 メルシャン株式会社
 【代表者】 鈴木 忠雄
 【電話番号】 03(3231)3853
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 053604
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

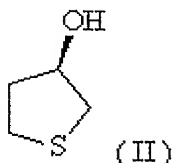
式(I)、

【化 1】



で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンの、
式(II)、

【化 2】



で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールへの生物学的変換方法による、式(II)
)で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールの製造方法であって、

(A) 前記生物学的変換方法を行うことができるものであって、かつペニシリウム (*Penicillium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属またはストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属に属する菌株またはその培養菌体の調製物の存在下で、式(I)で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンをインキュベーション処理する工程、

(B) インキュベーション処理液から式(II)で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールを採取する工程、
を含んでなる方法。

【請求項 2】

生物学的変換方法を行うことができる菌株が、ペニシリウム・ビナセウム (*Penicillium v. inaceum*)、アスペルギルス・オカラセウス (*Aspergillus ochraceus*) またはストレプトマイセス・ミシガネンシス (*Streptomyces michiganensis*) に属する菌株である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

生物学的変換方法を行うことができる菌株が、ペニシリウム・ビナセウム (*Penicillium v. inaceum*) IAM7143、アスペルギルス・オカラセウス (*Aspergillus ochraceus*) ATCC18500 またはストレプトマイセス・ミシガネンシス (*Streptomyces michiganensis*) IF012797 に属する菌株である請求項 1 または 2 記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】光学活性テトラヒドロチオフエン誘導体の製造方法

【技術分野】

【0001】

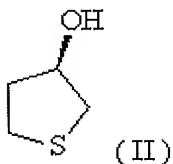
本発明は、光学活性な医薬品の合成中間体として利用可能な(R)- テトラヒドロチオフエン-3-オール⁽¹⁾の生物学的変換による製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

式(II)で示される(R)- テトラヒドロチオフエン-3-オールは、ペネム系抗生物質の合成中間体として用いられる（特許文献1参照）。

【化3】



【0003】

(R)- テトラヒドロチオフエン-3-オール⁽¹⁾の製造方法としては、イリジウム触媒を用いる方法（特許文献2参照）、金属錯体触媒を用いる方法（特許文献3参照）、アミノ酸から合成する方法（非特許文献1参照）、2,3-ジヒドロチオフエンから合成する方法（非特許文献2参照）等の化学合成による方法が知られている。しかしこれらの方法は、高価な試薬を必要としたり、複数の反応工程を経ることから収量が低くなる等の問題があり、工業的製法として満足できる方法とは言えない。

【0004】

またラセミのテトラヒドロチオフエン-3-オール⁽¹⁾をエステル化し、このエステルをリパーゼ等の酵素を用いて光学分割して得る方法が知られている（非特許文献3参照）。しかし、この方法は、ラセミ体を原料とした光学分割法のため、目的の光学活性体の理論収率は最大でも50%であり、収率的に満足できる方法ではない。また、一般的にリパーゼ等の酵素を使用した選択的加水分解あるいはエステル化による光学分割法は、酵素反応工程以外に、基質への保護基の導入、あるいは反応生成物の脱保護等の工程を必要とする場合があり、結果的に工程が複雑になって工業的製法としてあまり有利な方法とは言えない。

【0005】

【特許文献1】特開昭63-287781号公報

【特許文献2】特開平04-139192号公報

【特許文献3】特開平04-139140号公報

【非特許文献1】ジャーナル・オブ・オルガニック・ケミストリー（J.Org.Chem.）57, 4354(1992)

【非特許文献2】ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ（J.Am.Chem.Soc.）108, 2049-2054(1986)

【非特許文献3】バイオカタリシス（Biocatalysis）9, 61-69(1994)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、前記した立体選択的還元法あるいは光学分割法が抱える問題点（例えば、所望とする光学活性体と反対の立体配置をもつ光学活性体の副生、毒性の高い化合物の使用、選択性の低下等）の少ない生物学的変換方法によるテトラヒドロチオフエン-3-オン⁽²⁾を原料とした光学活性なテトラヒドロチオフエン-3-オール⁽¹⁾の新規な製造方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

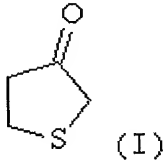
【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために広範な微生物群から下記式 (I) で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンの 3 位オキシ基を立体選択的に還元し、光学活性な (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールに変換しうる微生物を探索したところ、高い選択性を有する微生物を見出し、本発明を完成した。

【0008】

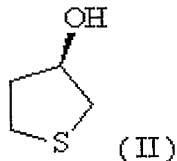
すなわち、本発明は、式 (I)

【化 4】



で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンの、
式 (II)、

【化 5】



で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールへの生物学的変換方法による、式 (II) で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールの製造方法であって、

(A) 前記生物学的変換方法を行うことができるものであって、かつペニシリウム (*Penicillium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属またはストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属に属する菌株またはその培養菌体の調製物の存在下で、式 (I) で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンをインキュベーション処理する工程、

(B) インキュベーション処理液から式 (II) で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールを採取する工程、を含んでなる方法、を提供するものである。

【0009】

本発明の生物学的変換方法では、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属またはストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属のいずれかの属に属し、前記式 (I) で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンを前記式 (II) で示される (R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールへ変換する能力を有する微生物の培養菌体またはその培養菌体の調製物であれば、種および株の種類を問うことなく使用することができる。またこれらの菌株から分離され、前記変換反応を触媒する酵素（以下、テトラヒドロチオフエン-3-オン還元酵素というときがある）を用いることもできる。

【0010】

そのような微生物の好ましい例として、ペニシリウム・ビナセウム (*Penicillium vinaceum*)、アスペルギルス・オカラセウス (*Aspergillus ochraceus*)、ストレプトマイセス・ミシガネンシス (*Streptomyces michiganensis*) 等に属する微生物を挙げることができる。

【0011】

それらの中で特に好ましい例として、ペニシリウム・ビナセウム (*Penicillium vinaceum*) IAM7143、アスペルギルス・オカラセウス (*Aspergillus ochraceus*) ATCC18500 またはストレプトマイセス・ミシガネンシス (*Streptomyces michiganensis*) NBRC12797 等を具体的に挙げることができる。

【0012】

またその他の前記微生物は、それらの株名に付与されている保存機関に保存されており、容易に入手することができる。保存機関は以下のとおりである。IAM: 東京大学応用微生物研究所、ATCC: American Type Culture Collection、NBRC: 独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部生物資源部門

【0013】

本発明によれば、前述した性質をもつ微生物の培養菌体またはその培養菌体の調製物の存在下で、出発原料(基質)であるテトラヒドロチオフェン-3-オンがインキュベーション処理される。この処理は前記微生物を培養する際、または培養後その培養液中に基質を添加して行うか、あるいは場合により前記微生物の培養菌体を集菌し、例えばそのまま、もしくは凍結乾燥処理、噴霧乾燥処理、有機溶媒(例えばアセトン)処理、破碎処理等の前処理を行った後に使用するか、テトラヒドロチオフェン-3-オン還元酵素を粗精製または精製単離した後に緩衝液中に懸濁し、これに基質を添加し、インキュベーションして反応を行うこともできる。

【0014】

培養液への基質の添加は、培養前または培養開始後一定期間経過したときのいずれの時期に行ってもよい。また、主に基質の溶解補助等の目的でメタノール、エタノール、メチルエチルケトン、クロロアセトン等を同時に加えることが出来るが、これに限定されるものでないことは言うまでも無い。上記菌体は上記の微生物を栄養源含有培地に接種し、好氣的に培養することにより製造できる。このような培養菌体の調製物を用意するための微生物の培養および、基質が添加された状態で行われる微生物の培養は、原則的には一般微生物の培養方法に準じて行うことができるが、通常は液体培養による振とう培養、通気攪拌培養等の好氣的条件下で実施するのが好ましい。

【0015】

培養に用いられる培地としては、これら微生物が生育できる培地であればよく、各種の合成培地、半合成培地、天然培地等いずれも利用可能である。培地組成としては炭素源としてのグルコース、マルトース、キシロース、フルクトース、シュクロース、スターチ、デキストリン、グリセリン、マンニトール、オートミール等を単独または組合せて用いることができる。

【0016】

窒素源としては、ペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、麦芽エキス、酵母エキス、尿素、クエン酸アンモニウム、フマル酸アンモニウム等の有機窒素源、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸水素アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム等の無機窒素源を、単独または組合せて用いることができる。その他、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化コバルト等の塩類、ビタミン類も必要に応じ添加して使用することができる。なお、培養中発泡が著しいときは、公知の各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできる。

【0017】

好適な培地として、例えば、F1培地(ポテトスターチ20g/L、グルコース10g/L、大豆粉20g/L、リン酸二水素カリウム1g/L、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g/L)あるいはC培地(ポテトスターチ20g/L、グルコース20g/L、大豆粉20g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム2.5g/L、炭酸カルシウム3.2g/L、金属イオン混合液2ml/L(金属イオン混合液組成:硫酸銅・5水和物0.25g/L、硫酸亜鉛・7水和物0.25g/L、塩化マンガン・4水和物0.25g/L))を挙げることができる。

【0018】

培養条件は、上記微生物が良好に生育し得る範囲内で適宜選択することができる。通常、pH5.0~10.0、20~30℃、好ましくはpH6.5~8.0、25~28℃であり、通常1~3日、好ましくは3日程度培養する。上述した各種の培養条件は、使用する微生物の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更でき、最適条件を選択できる。

【0019】

また、培養菌体の調製物は、培養終了後、遠心分離または濾過により分離した菌体または凍結乾燥処理、噴霧乾燥処理、有機溶媒処理、破碎処理等の前処理を行った菌体を適当な溶液に懸濁して調製する。菌体の懸濁に使用できる溶液は、前記した培地であるか、あるいはトリス-酢酸、トリス-塩酸、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウ

ム、リン酸カリウム等の緩衝液を単独または混合したものである。緩衝液のpHは、好ましくは5.0~9.0、さらに好ましくは7.0~8.5である。培養菌体そのものを用いる場合はグルコース、グリセロール等のエネルギー源を、培養菌体処理物を用いる場合はNAD(P)Hや補酵素再生系を添加することも有効である。補酵素再生系の一例としてはグルコース、グルコースデヒドロゲナーゼ、NAD(P)⁺の組み合わせが挙げられる。

【0020】

基質となるテトラヒドロチオフエン-3-オンは、液体のままか、あるいは水溶性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等に希釈して培養液または菌体の懸濁液に添加することができ、その添加量は、例えば培養液の場合、培養液1リットル当たり0.1~100gであり、好ましくは1~20gである。基質の添加は一度に行ってもよいが、添加量が比較的多い場合は、数度にわたって、または連続的に行ってよい。基質添加後は、1~3日間、好ましくは1日間、振とうあるいは通気攪拌等の操作を行い、反応を進行させることにより基質である式(I)で示されるテトラヒドロチオフエン-3-オンを、式(II)で示される目的の(R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールに変換することができる。

【0021】

こうして生成した、目的の(R)-テトラヒドロチオフエン-3-オールを反応混合物から単離するには、種々の既知精製手段を選択、組合せて行うことができる。例えば、疎水性吸着樹脂への吸着・溶出や、酢酸エチル、n-ブタノール等を用いた溶媒抽出、シリカゲル等によるカラムクロマトグラフィー法、あるいは薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、蒸留等を、単独あるいは適宜組合せ分離精製することができる。

【実施例】

【0022】

以下、本発明について具体例を挙げてより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0023】

実施例 1

F1培地（ポテトスターチ20g/L、グルコース10g/L、大豆粉20g/L、リン酸二水素カリウム1g/L、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g/L）を250mL容三角フラスコに25mL分注し、121℃、20分間高圧蒸気滅菌した。これにアスペルギルス・オカラセウス(*Aspergillus ochraceus*) ATCC18500を接種し、25℃、72時間震盪培養した。得られた培養液にテトラヒドロチオフエン-3-オンを30mg加え、25℃で24時間震盪した。

【0024】

得られた反応液を酢酸エチル(15mL x 3)で抽出した。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過濃縮した。残渣を分取用TLC(ヘキサン/酢酸エチル=1/1)にて分離精製し目的物を12.4mg(41%)、光学純度81%e.e. (R)で得た。; $[\alpha]_D = +8.8$ (c=0.5, CHCl₃); ¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.75(m, 2H), 2.15(m, 1H), 2.82-3.17(m, 4H), 4.5(m, 1H)。

【0025】

光学純度は光学分割カラム（キラルパックAS-H (0.46 x 25cm) ダイセル化学工業、）を付した高速液体カラムクロマトグラフィー（移動層：ヘキサン/イソプロパノール=9/4、流量：1ml/min.、温度：30度、検出：210nm）により決定した。絶対配置は、J. Am. Chem. Soc. 108, 2049(1986)に記載された比旋光度と比較して決定した。

【0026】

実施例 2

ペニシリウム・ビナセウム(*Penicillium vinaceum*) IAM7143を用い基質の添加量を50mgとした以外、全て実施例1と同様に変換反応を行った。結果、目的物を11mg(22%)、光学純度91%e.e. (R)で得た。

【0027】

実施例 3

ストレプトマイセス・ミシガネンシス (*Streptomyces michiganensis*) NBRC12797を用いる
こと以外、全て実施例2と同様に変換反応を行った。結果、目的物を32mg(79%)、光学純度
88%e. e. (R)で得た。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 光学活性な医薬品の合成中間体として利用可能な光学活性テトラヒドロチオフエン誘導体の生物学的変換による新規な製造方法の提供。

【解決手段】 出発原料であるテトラヒドロチオフエン-3-オンを、光学活性な(R)- テトラヒドロチオフエン-3-オールに変換する能力を有する微生物の培養菌体またはその培養菌体の調製物の存在下、出発原料をインキュベーション処理し、その処理液から目的物である光学活性な(R)- テトラヒドロチオフエン-3-オールを採取する。なお微生物としては、ペニシリウム(Penicillium)属、アスペルギルス(Aspergillus)属またはストレプトマイセス(Streptomyces)属に属するものを挙げることができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 0 3 6 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 1 5]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号

氏 名

メルシャン株式会社